

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Endofit Mangrove

Bakteri endofit yaitu mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman dan akan bersaing dengan patogen serta keberadaannya dalam jaringan tanaman tidak membahayakan inangnya. Penggunaan endofit yang bersifat antagonis ini memiliki beberapa keuntungan dibanding dengan penggunaan mikroba antagonis lain, diantaranya yaitu mikroba endofit sudah terbentuk dalam tanaman yang akan tetap ada atau bertahan selama perkembangan tanaman dan terus memberikan perlindungan bagi tanaman (Hayward & Hartman 1994). Ditambahkan oleh Kasi, *et al.*, (2015), dalam satu tumbuhan dapat diisolasi lebih dari satu bahkan puluhan jenis mikroba endofit yang masing-masing mempunyai potensi untuk memproduksi satu atau lebih senyawa bioaktif. Oleh sebab itu, penelitian-penelitian untuk mengeksplorasi keanekaragaman jenis serta kandungan zat bioaktif yang diproduksi oleh mikroba endofit tersebut perlu dilakukan.

Mikroorganisme endofit dapat ditemukan hampir di setiap tanaman di bumi. Organisme ini terdapat di dalam jaringan dan bersimbiosis dengan tanaman tersebut. Endofit dapat memengaruhi tanaman dimana mereka tinggal untuk memproduksi senyawa yang bertujuan untuk melindunginya dari aktivitas predasi maupun dominasi spesies dari hubungan mutualistik diatas, diduga mikroorganisme endosimbion ini mampu menghasilkan senyawa dengan struktur yang unik dengan aktivitas beragam yang dapat dikembangkan sebagai bahan obat di waktu mendatang untuk mengobati berbagai macam penyakit yang dihadapi oleh manusia (Pongantung *et al.*, 2015).

2.2 Mangrove *Lumnitzera Littorea*

Lumnitzera littorea merupakan salah satu jenis mangrove yang tergabung dalam family Combretaceae, dan di Indonesia lebih dikenal dengan nama api-api, uding, duduk agung, duduk gede, geriting, possi-poss, randai, riang laut, sesak sesop serta taruntum. Memiliki pohon yang selalu hijau serta tumbuh secara tersebar, dan ketinggian pohonnya bisa mencapai 25 m. Memiliki akar nafas berbentuk lutut, daun yang agak tebal berdaging, bunga yang bersifat biseksual, serta buah yang berbentuk seperti pot atau jambangan tempat bunga/elips dan berwarna hijau keunguan (Halidah, 2014). *Lumnitzera littorea* memiliki nama lokal teruntum merah, jenis mangrove ini merupakan mangrove berpohon kecil (mencapai ketinggian 8m) dan merupakan salah satu anggota family combretaceae. Jenis ini tersebar di sekitar pantai timur Afrika, Asia Tenggara, Australia dan Polynesia (Saad *et al.*, 2011).



Gambar 1. (a) Tumbuhan mangrove *Lumnitzera littorea*, (b) Bunga dan buah *Lumnitzera littorea* (Halidah, 2014)

Lumnitzera littorea termasuk dalam salah satu jenis mangrove yang banyak tumbuh di daerah tropis, dan dikenal sebagai salah satu penanda wilayah peralihan antara hutan daratan dengan hutan mangrove. Mangrove ini merupakan jenis mangrove sejati, hanya dapat tumbuh pada daerah yang berbatasan dengan daerah daratan, atau biasa disebut dengan daerah pinggiran zona mangrove. Spesies ini secara umum tersebar luas di seluruh wilayah hutan mangrove (Halidah, 2014).

2.3 Enzim

Enzim merupakan suatu alat molekuler yang luar biasa dan menentukan corak perubahan kimia dalam sel. Enzim ini berbentuk protein yang berperan dalam mengkatalis suatu sistem biologi atau reaksi-reaksi biokimia, serta enzim juga berperan dalam perubahan berbagai bentuk energi. Enzim memiliki satu sifat yang sangat mencolok, yaitu daya katalik dan spesifitas. Dan juga kerja dari banyak enzim sangat terkendali (Stryer, 2000). Sebagaimana protein pada umumnya, molekul enzim juga mempunyai struktur tiga dimensi. Diantaranya jenis-jenis struktur tersebut, diperlukan suhu dan pH yang sesuai. Apabila kedua faktor tersebut tidak terpenuhi, enzim akan kehilangan sifat dan kemampuannya (Sadikin, 2002).

Enzim memiliki peranan yang sangat penting dalam berbagai reaksi kimia yang terjadi di dalam sel yang mungkin sangat sulit dilakukan oleh reaksi kimia biasa, dan merupakan molekul biopolimer dan tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap (Darmajana, 2008). Fungsi suatu enzim yaitu sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi dalam sel maupun di luar sel. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10⁸ sampai 10¹¹ kali lebih cepat dari pada apabila reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis (Poedjiadi, 1994).

Tipe reaksi kimiawi yang dikatalis merupakan dasar bagi klasifikasi dan penamaan enzim. Sifat khusus inilah yang membedakan satu enzim dengan yang lainnya. Bagi setiap enzim dianjurkan ada dua nama, yaitu nama biasa atau nama kerja dan nama sistematis. Misalnya, heksosinase adalah nama biasa dari ATP: heksose fosfotransferase, enzim yang menambahkan sebuah gugusan fosfat pada glukosa (Pelczar dan Chan, 2005). Klasifikasikan enzim berdasarkan tipe reaksi yang dikatalis dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasikan enzim berdasarkan tipe reaksi yang dikatalis.

No.	Nama enzim	Tipe reaksi yang dikatalis
1	Oksidoreduktase	Enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Golongan enzim ini dibagi menjadi 2 macam enzim yang paling utama yakni oksidase dan dehidrogenase. Oksidase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen. Dehidrogenase adalah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.
2	Transferase	Enzim yang ikut dalam reaksi pemindahan suatu gugus.
3	Hidrolase	Kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air.
4	Liase	Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini diantaranya adalah amilase, invertase, selulase dan sebagainya. Enzim yang aktif dalam pemecahan ikatan C-C dan C-O dengan tidak menggunakan molekul air.
5	Isomerase	Enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom substrat, sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat atau dengan perubahan isomer posisi misalnya mengubah aldosa menjadi ketosa.
6	Ligase	Enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan-ikatan tertentu, misalnya pembentukan ikatan C-C, C-O dan C-S dalam biosintesis koenzim A serta pembentukan ikatan C-N dalam sintesis glutamin.

Sumber : Winarno (2010).

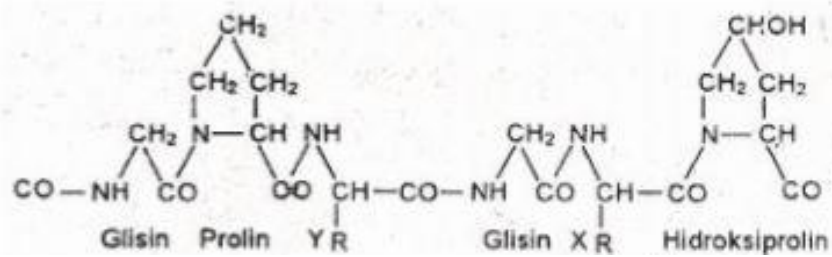
Menurut Pelczar dan Chan (2005) aktivitas enzim bakteri (atau sel-sel atau jaringan apa saja) dapat ditentukan melalui berbagai teknik. Beberapa prosedur membutuhkan alat-alat khusus dan rumit. Lainnya hanya membutuhkan sebuah tabung reaksi dan beberapa reagen. Semuanya didasarkan pada beberapa prinsip sederhana. Untuk menguji aktivitas enzim perlu diketahui hal-hal berikut ini :

1. Sifat reaksi yang dikatalisnya
2. Kofaktor dan koenzim yang dibutuhkan
3. Konsentrasi baik substrat maupun kofaktor atau koenzim
4. pH optimum
5. Suhu optimum
6. Metode analitik sederhana untuk menentukan lenyapnya substrat atau munculnya produk-produk reaksi

2.4 Gelatin

Gelatin merupakan polipeptida yang didapatkan dengan hidrolisis termal dari kolagen. Gelatin telah diaplikasikan dengan sangat luas dalam berbagai bidang industri seperti industri makanan, farmasi, kosmetik dan fotografi. Dalam industri makanan, gelatin secara luas digunakan sebagai pengemulsi, penstabil dalam sistem emulsi. Gelatin juga digunakan dalam berbagai industri pangan (permen, krim, caramel, selai, yoghurt, susu olahan, sosis), farmasi (kapsul, pelapis vitamin, tablet), kosmetika (lotion, sabun), fotografi (film), korek api, pelapis kertas dan pelapis kayu interior. Fungsi gelatin adalah sebagai pengemulsi, penstabil pada sistem emulsi. Gelatin terbagi menjadi dua tipe berdasarkan perbedaan proses pengolahannya, yaitu tipe A dan tipe B. Dalam pembuatan gelatin tipe A, bahan baku diberi perlakuan perendaman dalam larutan asam sehingga proses ini dikenal dengan sebutan proses asam.

Sedangkan dalam pembuatan gelatin tipe B, perlakuan yang diaplikasikan adalah perlakuan basa (Al-Saidi *et al.*, 2010). Struktur kimia dari gelatin dapat dilihat pada Gambar 2.



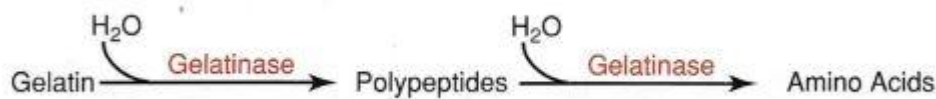
Gambar 2. Ikatan kimia gelatin (Minah *et al.*, 2016).

Menurut Minah, *et al.* (2016) pada prinsipnya proses pembuatan gelatin dapat dibagi menjadi dua macam, yaitu proses asam dan proses basa. Perbedaan kedua proses ini terletak pada proses perendamannya. Berdasarkan kekuatan ikatan kovalen silang protein dan jenis bahan yang diekstrak, maka penerapan jenis asam maupun basa organik dan metode ekstraksi lainnya seperti lama hidrolisis, pH dan suhu akan berbeda-beda. Proses produksi utama gelatin dibagi dalam tiga tahap yaitu: tahap persiapan bahan baku antara lain penghilangan komponen non kolagen dari bahan baku, tahap konversi kolagen menjadi gelatin, tahap pemurnian gelatin dengan penyaringan dan pengeringan. Analisis proksimat adalah suatu metode analisis kimia untuk mengidentifikasi kandungan nutrisi seperti protein, karbohidrat, lemak dan serat pada suatu zat makanan dari bahan pakan atau pangan. Analisis proksimat memiliki manfaat sebagai penilaian kualitas pakan atau bahan pangan terutama pada standar zat makanan yang seharusnya terkandung di dalamnya.

2.5 Enzim Gelatinase

Gelatinase merupakan salah satu jenis enzim dari kelompok enzim protease, metaloproteinase ekstraseluler atau metaloproteinase yang mampu menghidrolisis gelatin dan senyawa lainnya seperti feromon, kolagen, kasein dan

fibrinogen. Enzim gelatinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme ini menghidrolisis gelatin menjadi senyawa yang lebih sederhana (polipeptida, peptida dan juga asam amino) yang dapat melewati membran sel dan digunakan oleh mikroorganisme. Enzim gelatinase ini dapat dibentuk oleh beberapa bakteri termasuk *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* dan *Serratia marcescens* (Balan *et al.*, 2012). Reaksi hidrolisis gelatin oleh enzim gelatinase dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi hidrolisis gelatin oleh enzim gelatinase (Leboffe dan Pierce, 1999).

Bakteri gelatinolitik mendegradasi lapisan gelatin dengan cara mengeluarkan enzim gelatinase yang dapat merombak gelatin menjadi bentuk yang dapat larut dalam air. Gelatin adalah protein bentuk molekul tunggal yang diturunkan dari hidrolisis kolagen. Bakteri yang memiliki kemampuan merombak gelatin digolongkan sebagai bakteri gelatinolitik. (Susatyo, 2006). Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri dapat menghasilkan enzim gelatinase, yaitu dengan menggunakan media gelatin murni yang ditunjukkan dari perubahan pada media. Apabila gelatin tetap padat, maka bakteri yang diujikan tidak memiliki enzim gelatinase dan sebaliknya bila terjadi perubahan konsistensi menjadi cair maka bakteri yang diuji memiliki enzim gelatinase (Benson, 1998).

2.6 Bakteri

Nama bakteri berasal dari Bahasa Yunani "*bacterion*" yang artinya batang atau tongkat, dan nama tersebut sekarang digunakan dalam menyebutkan sekelompok mikroorganisme bersel satu, tubuhnya bersifat prokariotik, yaitu

tubuhnya terdiri atas sel yang tidak mempunyai pembungkus inti. Bakteri berkembang biak dengan cara membelah diri, dan walaupun hanya bersel satu namun bakteri memiliki beberapa organel yang dapat melaksanakan beberapa fungsi hidup (Waluyo, 2016).

2.6.1 Morfologi Bakteri

Ukuran sel bakteri sangat kecil (mikroskopis). Ukuran sel bakteri yang mikroskopis dapat terlihat dengan jelas dengan menggunakan mikroskop. Dengan bantuan mikroskop juga dapat diamati bentuk-bentuk sel bakteri. Bentuk-bentuk dasar bakteri terdiri atas berbagai macam. Namun demikian dapat dikelompokkan dalam bentuk-bentuk dasar sel bakteri. Bentuk sel bakteri tidak akan berubah dari satu bentuk ke bentuk yang lain, selama struktur dinding selnya tidak rusak atau hilang (Boleng, 2015).

Menurut Irianto (2006), bentuk bakteri bermacam-macam, yaitu sebagai berikut:

- a. **Bakteri Berbentuk Bulat (Bola)** Bakteri berbentuk bulat atau bola dinamakan kokus (*coccus*), dapat dibedakan atas:
 - Monokokus, yaitu bakteri berbentuk bola tunggal.
 - Diplokokus, yaitu bakteri berbentuk bola yang bergandengan dua-dua.
 - Sarkina, yaitu bakteri berbentuk bola yang berkelompok empat-empat sehingga bentuknya mirip kubus.
 - Streptokokus, yaitu bakteri bentuk bola yang berkelompok memanjang membentuk rantai.
 - Stapilokokus, yaitu bakteri berbentuk bola yang berkoloni membentuk sekelompok sel tidak teratur, sehingga bentuknya mirip dompolan buah anggur.
- b. **Bakteri Berbentuk Batang**
 - Basil tunggal, yaitu bakteri yang hanya berbentuk satu batang tunggal.

- Diplobasil, yaitu bakteri berbentuk batang yang bergandengan dua-dua.
- Streptobasil, yaitu bakteri berbentuk batang yang bergandengan memanjang membentuk rantai.

c. Bakteri Berbentuk Melilit

- Spiral, yaitu golongan bakteri yang bentuknya seperti spiral, dan umumnya sel tubuhnya kaku.
- Vibrio, atau bentuk koma, yaitu bakteri yang dianggap sebagai bentuk spiral tak sempurna.
- Spirochaetal, yaitu golongan bakteri berbentuk spiral yang bersifat lentur, pada saat bergerak tubuhnya dapat memanjang dan mengerut.

Menurut Waluyo (2016), pengamatan terhadap bakteri tidak hanya dilakukan secara individual/satu persatu, namun juga dapat dilakukan secara kelompok atau biasa disebut dengan koloni. Bentuk koloni berbeda-beda untuk setiap spesies, dan bentuk itu merupakan ciri khas bagi suatu spesies tertentu. Berikut adalah beberapa sifat umum yang perlu diperhatikan pada koloni yang tumbuh di permukaan medium:

- Besar kecilnya koloni. Ada koloni yang hanya berupa titik, ada yang melebar sampai menutup permukaan medium.
- Bentuk. Ada koloni yang bulat, ada yang memanjang. Ada yang tepinya rata, dan ada yang tepinya tidak rata.
- Kenaikan permukaan. Ada koloni yang rata dengan permukaan medium, ada yang timbul, yakni menjulang tebal di atas permukaan medium.
- Halus kasarnya permukaan. Ada koloni yang permukaannya halus, ada yang permukaannya kasar dan tidak rata.
- Wajah permukaan. Ada koloni yang permukaannya mengkilat, ada yang permukaannya suram.

- Warna. Kebanyakan koloni bakteri berwarna keputihan atau kekuning-kuningan, tetapi juga ada koloni yang berwarna kemerah-merahan, coklat, jingga, biru, hijau, dan juga ungu.
- Kepekatan. Ada koloni yang lunak seperti lendir, ada yang lunak seperti mentega, ada yang keras dan kering.

2.6.2 Struktur Dinding Sel Bakteri

Dinding sel bakteri berfungsi untuk memberikan bentuk tertentu pada bakteri, untuk mengatur keluar masuknya zat kimia, serta memegang peranan dalam pembelahan sel. Dinding sel bakteri sangat tipis, sifatnya elastis, terletak diantara kapsula dan membran sitoplasma dengan susunan kimia kompleks. Dinding sel bakteri ini terdiri dari berbagai macam bahan organik seperti selulosa, hemiselulosa, dan khitin (yaitu karbohidrat yang mengandung unsur N), hal ini tergantung spesies bakteri. Struktur dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif mempunyai perbedaan. Dinding sel bakteri gram negatif merupakan struktur berlapis, sedangkan bakteri gram positif mempunyai 1 lapis yang tebal. Meskipun struktur berbeda, susunan kimia dari dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang mencolok. Bagian dinding sel yang memberikan sifat kaku dinamakan peptidoglikan (Waluyo, 2016).

Menurut Boleng (2015), sel bakteri gram positif dan sel bakteri gram negatif memiliki ciri khasnya masing-masing. Ciri-ciri khas bakteri gram positif dan bakteri gram negatif tersebut mencakup struktur dan komposisi dinding sel, kerentanan terhadap penisilin, pengaruh zat warna terhadap pertumbuhan selnya, persyaratan nutrisi, dan gangguan fisik. Komponen dan ketebalan lapisan-lapisan pada dinding sel untuk bakteri gram positif dan bakteri gram negatif berbeda. Ada perbedaan lain selain sifat dinding sel antara sel bakteri gram positif dengan bakteri gram negatif. Perbedaan dinding sel bakteri gram positif dengan bakteri gram negatif dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Perbedaan ciri sel bakteri gram positif dengan sel bakteri gram negatif.

No	Aspek perbedaan	Sel bakteri gram positif	Sel bakteri gram negatif
1	Struktur dinding sel	Tebal (15-18 nm) Berlapis tunggal	Tipis (10-15 nm) Berlapis tiga
2	Komposisi dinding sel	Kandungan lipid rendah (1-4%) Peptidoglikan sebagai lapisan tunggal. Komposisi utama merupakan lebih dari 50% berat kering sel bakteri. Ada asam teikoat	Kandungan lipid tinggi (11-22%) Peptidoglikan ada dalam lapisan kaku sebelah dalam. Jumlahnya sedikit, 10% berat kering Tidak ada asam teikoat
3	Kerentanan terhadap penisilin	Lebih rentan	Kurang rentan
4	Pertumbuhan dihambat oleh zat warna dasar, misalnya ungu Kristal	Dihambat dengan nyata	Tidak dihambat dengan nyata
5	Persyaratan nutrisi	Lebih rumit	Kurang rumit
6	Gangguan fisik	Lebih resisten	Kurang resisten

Sumber : Boleng (2015).

2.7 Isolasi Mikroorganisme

Pada umumnya, mikroba yang ada di lingkungan sekitar kita berada dalam sebuah populasi campuran, dan akan sulit untuk menemukan mikroba dalam kondisi spesies tunggal. Untuk itu dibutuhkan sebuah metode isolasi agar kita dapat mengidentifikasi dan mencirikan bakteri tersebut (Karliana, 2009). Sesuai dengan yang dikatakan oleh Pelczar (1986) bahwa sebelum meneliti suatu koloni bakteri, khususnya dalam skala laboratorium, maka harus dilakukan isolasi dari koloni tersebut ke sebuah media baru, dimana biakan dalam media baru tersebut hanya ditumbuhkan jenis bakteri yang kita butuhkan, biasanya biakan seperti ini dinamakan biakan murni.

Isolasi merupakan kegiatan pemisahan mikroorganisme yang akan diuji dari mikroorganisme lain dengan menggunakan media selektif, sehingga diharapkan akan diperoleh biakan atau kultur murni. Media selektif adalah media khusus untuk menumbuhkan mikroorganisme tertentu yang tumbuh pada media

selektif. Identifikasi merupakan kegiatan yang dilakukan untuk mengetahui jenis organisme tertentu dengan tahap pengamatan, pengujian, pencatatan dan identifikasi berdasarkan hasil pengujian (Susatyo, 2006).

Ada beberapa teknik isolasi bakteri menurut Hadioetomo (1993) yaitu :

a. Metode Cawan Gores (*Streak Plate*)

Prinsip metode ini yaitu mendapatkan koloni yang benar-benar terpisah dari koloni yang lain, sehingga mempermudah proses isolasi. Cara ini dilakukan dengan menggoreskan ose pada cawan petri berisi media steril.

b. Metode Cawan Sebar (*Spread Plate*)

Teknik *Spread Plate* (cawan sebar) adalah suatu teknik di dalam menumbuhkan mikroorganisme di dalam media agar dengan cara menuangkan stok kultur bakteri atau menghapuskannya di atas media agar yang telah memadat.

c. Teknik Pengenceran (*Dilution Plate*)

Tujuan dari teknik ini adalah melarutkan atau melepaskan mikroba dari substratnya ke dalam air sehingga lebih mudah penanganannya (pemindahannya ke tabung atau cawan). Sampel yang telah diambil kemudian disuspensikan dalam akuades steril.

Bakteri yang tumbuh setelah ditanam biasanya muncul dalam bentuk berkoloni. Namun, dalam penelitian di laboratorium biasanya dibutuhkan biakan murni dari satu strain bakteri tertentu. Cara yang umum dilakukan untuk mengisolasi satu jenis bakteri adalah dengan menginokulasikan bakteri ke cawan dengan metode yang disebut *streaking*. Loop kawat (atau plastik steril) digunakan untuk memindahkan bakteri ke cawan yang telah berisi media untuk pertumbuhan bakteri tersebut. Cawan yang telah di strik kemudian diinkubasi pada suhu yang sesuai untuk bakteri tersebut (Nicklin *et al.*, 1999).

Menurut Waluyo (2016) ada beberapa teknik dalam melakukan penggesekan, yaitu:

- Goresan T, cara ini dilakukan dengan membagi lempengan menjadi 3 bagian dengan huruf T pada bagian luar dasar cawan petri. Inokulasikan daerah I sebanyak mungkin dengan gerakan sinambung. Panaskan ose dan biarkan dingin kembali. Gores ulang daerah 1 sebanyak 3-4 kali dan teruskan goresan di daerah II. Pijarkan kembali ose dan biarkan dingin kembali. Prosedur diatas diulangi untuk daerah III.
- Goresan kuadran, teknik ini sama dengan teknik goresan T, namun untuk goresan kuadran membagi lempengan menjadi 4 bagian.
- Goresan radian, goresan ini dimulai dari bagian pinggir lempengan. Pijarkan sengkeliit dan dinginkan kembali, putar lempengan agar 90^0 dan buat goresan terputus dimulai dari pinggir lempengan. Putar lempengan agar 90^0 dan buat goresan terputus di atas goresan sebelumnya.
- Goresan sinambung, goresan ini dilakukan dengan mengambil satu mata ose suspensi dan goreskan setengah permukaan lempengan agar. jangan pijarkan ose, putar lempengan 180^0 , gunakan sisi mata ose yang sama dan gores pada sisa permukaan lempengan agar.



Gambar 4. Goresan sinambung, T dan kuadran (Benson, 2002).

2.8 Identifikasi Mikroorganisme

2.8.1 Identifikasi Menggunakan Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram merupakan salah satu teknik identifikasi yang sangat penting dalam menentukan jenis bakteri. Bakteri digolongkan menjadi dua yaitu bakteri yang dapat menyerap warna violet atau biru tua disebut bakteri gram positif sedangkan bakteri yang dapat menyerap warna merah disebut bakteri gram negatif (Tito, 2014). Menurut Campbell, *et al.* (2003), struktur dinding sel akan menentukan respon pewarnaan. Bakteri diwarnai dengan suatu zat warna violet dan yodium, dibilas dengan alkohol dan kemudian diwarnai sekali lagi dengan zat warna merah. Bakteri gram positif yang sebagian besar dinding selnya mengandung peptidoglikan akan menjerat warna violet. Bakteri Gram Negatif memiliki lebih sedikit peptidoglikan, yang terletak di suatu gel periplasmik antara membran plasma dan suatu membran bagian luar. Zat warna violet yang digunakan dalam pewarnaan gram sangat mudah dibilas dari bakteri gram negatif, akan tetapi selnya tetap menahan zat warna merah.

Berdasarkan pewarnaan gram, dapat pula diketahui sifat dinding sel bakteri terhadap cat pewarna kristal violet dan safranin. Bakteri yang menyerap gram A (kristal violet) akan tetap berwarna ungu setelah pelunturan dengan gram C (alkohol aseton) disebut bakteri gram positif, sedangkan bakteri yang warna ungunya luntur pada pencucian dengan alkohol, akan menyerap zat warna gram D (safranin) sehingga akan berwarna merah muda disebut bakteri gram negatif (James *et al.*, 2008).

2.8.2 Uji Microbact

Uji fisiologi menggunakan *Microbact Identification System*, uji ini digunakan untuk mengetahui karakteristik fisiologi bakteri gram negatif, sehingga diketahui genus dan jenis bakteri. Format dalam bentuk test-strip atau microplate yang

sederhana, hasil dengan jelas terlihat sebagai reaksi-reaksi warna berbeda yang dapat diinterpretasikan menggunakan microbact. Setiap kit terdiri dari 12 (12A, 12B) atau 24 (24E) miniatur tes biokimia. Identifikasi organisme didasarkan pada perubahan pH dan pemakaian substrat (Arrizal *et al.*, 2013).

Pengujian dengan menggunakan microbact akan semakin mempermudah metode pengidentifikasian suatu mikroorganisme. Microbact mempunyai sistem yang dirancang untuk mengidentifikasi bakteri dengan komposisi substrat dan pereaksi yang telah distandarisasi. Pengujian dengan microbact memiliki beberapa ketentuan sebelum dilakukan pengujian, yaitu sampel isolat yang digunakan merupakan isolat yang telah dimurnikan dan dilarutkan ke dalam garam fisiologis. Prinsip kerjanya yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat ke dalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa - senyawa biokimia lain yang berjumlah 12 jenis. Suspensi bakteri yang dilarutkan ke dalam garam fisiologis ditambahkan ke masing-masing 12 sumur uji biokimia yang tersedia. Setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C reagen yang sesuai ditambahkan dan perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur microbact apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *patient record*. Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja dari tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*). Nama bakteri dilihat dengan menggunakan komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat (Oxoid, 2004).